

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-002896

(43)Date of publication of application : 06.01.1995

(51)Int.Cl.

C07K 14/51  
A23L 1/305  
A61K 38/55  
A61K 38/55  
C12N 9/99

(21)Application number : 05-084191

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 18.03.1993

(72)Inventor : SERIZAWA ATSUSHI  
ISHIKAWA HIDETOSHI  
TAKADA YUKIHIRO  
KATO TAKESHI  
KUMEGAWA MASAYOSHI

## (54) NEW CYSTEINE PROTEASE INHIBITOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new cysteine protease inhibitor having a high cysteine protease inhibitory effect, capable of inhibiting bone resorption by osteoclast and useful as a raw material of a food and a medicine.

CONSTITUTION: A cysteine protease inhibitor having following properties; (1) Binding properties to immobilized carboxymethylated papain. (2) Inhibitory activity on papain. (3)  $57 \pm 5$ KDa molecular weight (by SOS-PAGE). (4) Positive to PAS staining. This inhibitor can be obtained by adding NaCl to milk and treating it with carboxymethylated papain fixed to a carrier.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

19.02.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3344497

[Date of registration]

30.08.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-2896

(43)公開日 平成7年(1995)1月6日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C07K 14/51	8318-4H	
A23L 1/305		
A61K 38/55	ABJ	
		A61K 37/64
	8314-4C	ABJ
		ADD
	審査請求	未請求 請求項の数 1 F D (全6頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-84191	(71)出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22)出願日	平成5年(1993)3月18日	(72)発明者	芹澤 篤 北海道札幌市東区本町一条4丁目3-15-203
		(72)発明者	石川 秀敏 北海道札幌市西区八軒一条東2丁目2-33-606
		(72)発明者	高田 幸宏 埼玉県川越市小堤62-22
		(74)代理人	弁理士 藤野 清也
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規システインプロテアーゼインヒビター

(57)【要約】

【目的】 新規システインプロテアーゼインヒビターの提供。

【構成】 次の特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) 分子量 $57 \pm 5$  KDa (SOS-PAGEによる)。

(4) バス染色陽性。

乳に、NaClを添加し、カルボキシメチル化ババイン固定化担体で処理することによって得ることができる。

【効果】 高いシステインプロテアーゼ阻害活性を有し、破骨細胞による骨吸収を抑制する。食品原料、医薬として有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) SDS-PAGEによる分子量測定で $57 \pm 5$  KDaを示す。

(4) バス染色陽性。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規なシステインプロテアーゼインヒビターに関する。本発明の新規システインプロテアーゼインヒビターは破骨細胞の骨吸収作用に対する阻害効果を有し、骨の老化抑制を目的とした食品原料や医薬品として有用である。

## 【0002】

【従来の技術】システインプロテアーゼインヒビターは、活性中心にSH基を持つシステインプロテアーゼのタンパク質分解活性を阻害する物質であり、動物組織、細胞、血液中や尿中に見出されている。このようなシステインプロテアーゼインヒビターであって蛋白性の物質はシスタチンと総称されている。これまでに見出されたシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンは、その分子構造から3つのファミリーに分類されている(Biochem. J., 236, 312 (1986))。この文献によれば、ファミリー1(ステフィンファミリー)にはラット肝臓由来のシスタチン $\beta$ (Biochem. Biophys. Res. Commun., 115, 902 (1983))、ラット表皮由来のシスタチン $\alpha$ (Biochem. Biophys. Res. Commun., 121, 149 (1984))やヒトの白血球に見出されたステフィンA(Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1487 (1983))が含まれている。これらのシスタチンはいずれも分子量約12 KDaを示し、糖鎖を持たない。

【0003】また、ファミリー2には、ヒト尿由来のシスタチンC(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3024 (1982))、卵白シスタチン(Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1487 (1983))がこのファミリーに分類され、ウシ初乳由来のシスタチン(FEBS Lett., 186, 41 (1985))もこのファミリーに属する。このファミリーに属するものは分子量約13~15 KDaを示し、ファミリー1と同様に糖鎖を有していない。

【0004】さらに、血漿タンパク質であるヒトキニノーゲン(Biochemistry, 23, 5691 (1984))、ラットのTキニノーゲン(Biochem. Biophys. Res. Commun., 129, 280(1985))など、キニノーゲン類がファミリー3を構成している。キニノーゲン類は分子量78 KDaの高分子キニノーゲンと分子量45 KDaの低分子キニノーゲンが存在することが知られている。

【0005】システインプロテアーゼインヒビターの有

用な作用の1つとして、ウィルスの増殖阻害作用が確認されている(Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 1072(1985))。また、骨疾患モデルの動物の骨より、カルシウムの遊離を抑制する作用を示すことから、特開平2-223529号公報には抗アレルギー剤や骨疾患治療剤としての用途が開示されている。また特開昭61-225130号公報には卵白由来のシスタチンを精製し、これを抗ウイルス剤として使用する技術が開示されている。

10 【0006】また特開昭64-2582号公報にはシスタチン $\alpha$ の合成遺伝子、特開平1-71492号公報にはシスタチンBの合成遺伝子、特開平1-157390号公報にはシスタチンAの合成遺伝子がそれぞれ開示されており、遺伝子操作によりシスタチンを生産することも可能となってきた。

【0007】近年、高齢化の進展にともない、破骨細胞の骨吸収に起因する骨粗鬆症が急増している。現在、破骨細胞の吸収活性を押える医薬品として、カルシトニン製剤がある。しかしこの製剤は、医薬品として、サケやウナギ由来のホルモンを利用したホルモン製剤であり、食品素材から得られ、食品素材として使えるような安全な物質についてはあまり検討されていないのが現状である。

## 【0008】

【解決しようとする課題】本発明者らは、食品素材から得られる安全でしかも食品素材として使えるような物質について検索した。特に、乳中に存在することが知られているシステインプロテアーゼインヒビターについて検討をすすめたところ、従来乳由来のシスタチンとして知られているものと明らかに異なる、新規なシスタチン様物質を見出した。従って本発明は、乳由来の新規なシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターを提供することを課題とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明により提供される新規なシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターは乳から得ることができるものであり、下記の特性により特定される。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) SDS-PAGEによる分子量測定で $57 \pm 5$  KDaを示す。

(4) バス染色陽性。

なお、等電点pIについては、通常 $5.5 \pm 0.1$ を示す。

【0010】本発明物質の分子量は、乳由来のシスタチンとして知られている物質の分子量が、上記したように12 KDaまたは13~15 KDaであるのと比較して遙に大であり、さらに過ヨウ素酸シッフ染色法(periodi

c acid Schiff staining) によるバスマ染色陽性であることから糖鎖の存在が推定される。これに対して、乳由来の既知のシスタチンは糖鎖が結合していない。またキヌノーゲンとして知られているシスタチンファミリーの物質と比較した場合、本発明物質の分子量は  $57 \pm 5$  KDa であり、これに対してキヌノーゲンの分子量は  $78$  KDa の高分子キヌノーゲンと分子量  $45$  KDa の低分子キヌノーゲンが知られており、分子量測定により本発明物質はこれらの物質と明確に区別できる。このように、本発明により提供される物質は新規シスタチン様システ

【0011】本発明物質はヒト、ウシなど哺乳動物の乳から回収することができるが、特にウシ乳中から容易に回収することができる。本発明物質は泌乳期間のうち特に初乳中に大量に含有されるが、通常の乳中にも含有される。これらの乳を原料として、上述の文献に記載されているように、代表的なシステインプロテアーゼであるババインなどの親和性によるアフィニティークロマトグラフィー等の操作により分離することができる。

【0012】すなわち、ウシ脱脂初乳に、終濃度  $0.5$  M となるように NaCl を添加し、これをカルボキシメチル化ババイン固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し、ウシ初乳シスタチンと共に、シスタチンより高分子量のシステインプロテアーゼインヒビターの濃縮画分を調製する。この画分には既知のシスタチンと本発明物質を含有している。特に、NaCl の添加により非特異的吸着を抑制し、比活性の高い濃縮画分を調製できる。さらに、この画分をゲル濾過クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーによって、本発明物質であるシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターと既知のシスタチンを分離することができる。精製にあたっては、この他に蛋白質の精製方法として知られている逆相クロマトグラフィーや HPLC などの方法を組み合わせても良い。

【0013】本発明物質のババインに対する阻害活性は Barrett らの方法 ("Methods in enzymology" Vol.80 1981, pp771) に準じて測定することができる。即ち  $0.1$  M ベンゾイル-D,L-アルギニン-4-ニトロアニリド (Benzoyl-D,L-arginine-4-nitroanilide) ジメチルスルホキシド溶液を基質とし、測定用の緩衝液として、 $2$  mM の EDTA を含む、 $20$  mM リン酸緩衝液に使用直前にシステインを終濃度  $8$  mM となるように添加した溶液を用いて、比色法により酵素の活性を測定することによって、酵素の阻害率を求める方法である。本発明の新規システインプロテアーゼインヒビターは乳中のシスタチンの活性を上回っている。乳中のシスタチンを対照として

阻害活性を測定した場合、蛋白質あたりの阻害活性は  $2$  倍程度の阻害率を示す。

【0014】また、この本発明システインプロテアーゼインヒビターは、PAS 染色で陽性を示し、糖鎖の存在が確認される。SDS-PAGE による分子量測定では、還元及び非還元状態でいずれも  $57$  KDa を示した。本発明物質をゲル等電点電気泳動法 (Fast system Pharmacia 社製) により等電点を測定したところ、pI が、 $5.4 - 5.6$  を示した。

【0015】本発明物質は乳中に常在する蛋白質であり、その安全性は高いものと考えられる。従って、既知のシスタチンに見出される、抗ウイルス剤、抗アレルギー剤、骨疾患治療剤として用いることが可能であり、必要に応じて製剤化するか、あるいは単独で用いることが可能である。また食品や飲料中に混入させて用いることもできる。医薬品として用いる場合には経口剤、座剤などが例示できる。また蛋白質製剤は通常注射剤として用いられることが多いが、本発明物質においても同様に薬学的に有効な量の本発明物質を含有させ、製薬学的に許容しうる安定剤、賦形剤、等張化剤、無痛化剤、防腐剤、緩衝剤などを含有させて注射剤とすることもできる。

【0016】以下に実施例を示し本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【実施例 1】

##### 新規システインプロテアーゼインヒビターの精製

##### (1) インヒビター活性測定

システインプロテアーゼに対するインヒビター活性は、ババインに対する阻害活性を Barrett らの方法 ("Methods in enzymology" Vol.80 1981, pp771) に準じて測定した。 $0.1$  M ベンゾイル-D,L-アルギニン-4-ニトロアニリドジメチルスルホキシド溶液を基質とし、測定用の緩衝液として、 $2$  mM の EDTA を含む、 $20$  mM リン酸緩衝液に使用直前にシステインを終濃度  $8$  mM となるように添加した。ババインを  $0.5$  mg/ml の濃度で、システインを含まない測定用緩衝液に溶解した。また、反応停止用溶液として  $30\%$  酢酸溶液を使用した。測定は、以下の手順で行った。測定用チューブに  $1$  ml システインを含むリン酸緩衝液と  $0.1$  ml のババイン溶液を入れ、 $37^\circ\text{C}$  で  $5$  分間インキュベートした。次いで、試料溶液  $0.1$  ml 基質溶液  $30 \mu\text{l}$  を加え攪拌した。 $37^\circ\text{C}$  で  $30$  分間反応後、 $0.2$  ml の反応停止液を加え、 $410$  nm の吸光度を測定した。インヒビター活性は以下の数 1 式より求めた。

##### 【数 1】

比活性 [unit/mg] =  $(A_0 - A_1) \times 1.43 / 8.8 \times 30 \times W_1$

$A_0$  : インヒビターフリーの吸光度

$A_1$  : サンプルの吸光度

$W_1$  : サンプル溶液中のタンパク質量 [mg]

## 【0018】(2)濃縮画分の調製法

分娩後1日以内に搾乳したウシ初乳91から遠心分離により脱脂乳を調製し、終濃度0.5MとなるようにNaClを添加した。カルボキシメチル化ババインをトレスルトヨパール (Tresyl-Toyoparl, 東ソー製) に結合させた担体を50φ×150mmのカラムへ充填後、0.5M NaCl溶液で平衡化し、先のNaClを添加した脱脂乳を通液し、システインプロテアーゼインヒビターを吸着させた。通液後、0.5M NaCl溶液と0.1% Tween-20を含む0.5M NaCl 10溶液で順次カラムを洗浄した。次いで、20mM酢酸-0.5M NaCl溶液でシステインプロテアーゼインヒビターを溶出させた。溶出画分を直ちに1M NaOH溶液で中和し、446mlの濃縮画分を得た。

## 【0019】(3)シスタチンおよび新規システイン

## 各精製過程の精製度

	インヒビター活性		タンパク質		容量
	[unit/mg]	[unit]	[mg/ml]	[mg]	[ml]
脱脂乳	0.0001	145.9	180.0	1395(g)	7600
濃縮画分	0.197	104.4	1.19	530	446
CPI <sup>1)</sup>	0.405	96.9	1.69	239	141
coCys <sup>1)</sup>	0.240	1.5	0.0783	6.38	81.5

## 1) 新規システインプロテアーゼインヒビター

## 2) 乳由来シスタチン

【0021】図1には、濃縮画分および、単離した新規システインプロテアーゼインヒビター、乳由来シスタチンのSDS-PAGEの結果を示した。また、新規シス 30

## 初乳システインプロテアーゼインヒビターの特性

	分子量	等電点	糖鎖 <sup>1)</sup>
CPI	57kDa	5.4-5.6	+
coCys	13kDa	9.0 以上	-

## 1) pass 染色による定性

【0023】表1から、カルボキシメチル化ババインアフィニティークロマトグラフィーによる濃縮画分の調製では、精製倍率が約2000倍、回収率も70%を上回っており、効率の良い方法であることが確認できた。また、最終的に単離した新規システインプロテアーゼインヒビターは、従来からその存在が認められていた初乳シスタチンより約1.6倍高い比活性を示した。図1から、新規システインプロテアーゼインヒビターおよび乳由来シスタチン共に単一バンドを示し、不純物は認められず、還元及び非還元条件下でも変化が無いことから、両者共に単一のポリペプチドから成ることが示された。この結果から、本法により従来1種類と考えられていた

50

## ロテアーゼインヒビターの単離法

(1)で調製した濃縮画分を分画分子量6kDaのフローファイバー型UF膜 (旭化成製) により30mlに濃縮した。次いで、あらかじめ充填し、0.1M炭酸水素アンモニウム緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200HR (Pharmacia 製) カラム (50φ×750mm) に通液した。280nmの紫外外部吸収をモニターしたところ、タンパク質は3つの画分に分離され、その内2つの画分にインヒビター活性が認められた。このインヒビター活性を示す画分を回収し、凍結乾燥により、240mgの新規システインプロテアーゼインヒビターおよび、6.4mgの乳由来シスタチンをそれぞれ得た。表1に各精製過程の精製度を示す。

## 【0020】

## 【表1】

システインプロテアーゼインヒビターの特性を下記表2にまとめた。

## 【0022】

## 【表2】

画分から純粋な2種のインヒビターを同時に単離できることが確認された。

## 【0024】

## 【実施例2】

## 破骨細胞の骨吸収作用に対する阻害効果

全骨細胞を、13日齢授乳マウス (ICR種, 静岡動物センター) の大腿骨より調製した。摘出した骨の軟組織を取り除き、 $\alpha$ -Modified minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Flow Laboratories, (McLean, VA)) で5分間細かく破碎した。この破碎物を、さらに tube mixer で30秒間激しく攪拌し、3分間静置することにより大きな破碎物を除いて、破骨細胞を含む全骨細胞を用いた。

象牙片は、象牙塊をダイヤモンドカッターで厚さ 150  $\mu\text{m}$  に切断後直径 6 mm の円形に切り抜くことにより作製した。次いで、75%エタノールで滅菌後、 $\alpha$ -MEM で洗浄し 96well プレートに移した。

【0025】既存の破骨細胞によって、卵白由来シスタチン、乳由来シスタチン、乳由来高分子システインプロテアーゼインヒビターの骨吸収阻害効果を調べるために、200  $\mu\text{l}$  の  $\alpha$ -MEM に 5% 牛胎児血清を補った培地で  $3 \times 10^4$  の細胞を象牙片上で 37°C、 $\text{CO}_2$  インキュベーター (5%  $\text{CO}_2$ , 95% air) で 2 時間培養した。その後、卵白由来シスタチン、乳由来シスタチン、乳由来高分子システインプロテアーゼインヒビターを各 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度含む培地に置き換え、2 日毎に培地交換しながら培養した。培養終了後、96well プレート上で Handyengine (吉田精工) を 10 秒間作用させることにより細胞を取り除き、酸性ヘマトキシリン (sigma) で 3 分間染色した。破骨細胞によって、形成された骨吸収窩の総面積は、画像解析装置 (PIAS-LA55, PIAS) を用いて計測した。象牙片上の骨吸収窩は、顕微鏡 (対物レンズ,  $\times 2$  TV カメラ接続レンズ,  $\times 14$ ) からビデオカメラにより画像として取り込み、フィルター処理および、ノイズ除去後 2 値化 (黒、白) して、面積を測定した。

【0026】その結果を図 2 に示した。卵白由来シスタチン (Ew-Cys)、乳由来シスタチン (Co-Cys)、新規乳由来システインプロテアーゼインヒビター (HM-Cys) とともに、骨吸収を抑制しており、本発明の新規システインプロテアーゼインヒビターの骨吸収阻害効果が最も高かった。このことから、これらのタンパク質は、破骨細胞に直接作用して骨吸収を抑制していることが示唆された。また、これらの物質はいずれも織

維芽細胞、骨芽細胞の増殖には全く影響を及ぼさず、毒性も示さなかった。

#### 【0027】

【発明の効果】本発明により新規システインプロテアーゼインヒビターが提供される。本発明により提供される物質は既知のシスタチンと比較して高いシステインプロテアーゼ阻害活性を有し、破骨細胞に直接作用して骨吸収を抑制するなどシスタチンと同様の生理活性を示す。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】乳由来のシスタチンと本発明により得た新規システインプロテアーゼインヒビターの SDS-PAGE のパターンを示す。

#### 【符号の説明】

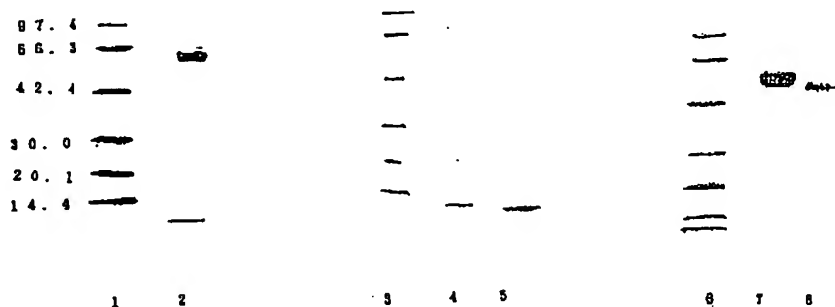
- 1, 3, 6 : 分子量マーカー
- 2 : システインプロテアーゼ濃縮物
- 4 : 乳由来シスタチン (還元状態)
- 5 : 乳由来シスタチン (非還元状態)
- 7 : 新規システインプロテアーゼインヒビター (還元状態)
- 8 : 新規システインプロテアーゼインヒビター (非還元状態)

【図 2】乳由来シスタチン、新規システインプロテアーゼインヒビター、卵白由来シスタチンの 0.1 マイクロモル当たりの骨吸収阻害活性を示す。

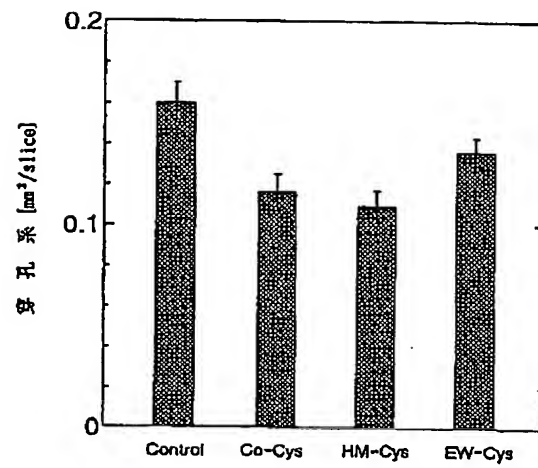
#### 【符号の説明】

- Control : インヒビター無添加
- Co-Cys : 乳由来シスタチン 0.1  $\mu\text{M}$  添加
- HM-Cys : 新規システインプロテアーゼインヒビター 0.1  $\mu\text{M}$  添加
- Ew-Cys : 卵白シスタチン 0.1  $\mu\text{M}$  添加

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>4</sup>

A 6 1 K 38/55

C 1 2 N 9/99

識別記号

A D D

庁内整理番号

9152-4B

F I

技術表示箇所

(72)発明者 加藤 健

埼玉県川越市新宿 5 - 11 - 3

(72)発明者 久米川 正好

埼玉県川越市霞ヶ関 3 - 1 - 16